

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]Application as sugar-alcohol extracted from a basidiomycete, an antiviral action substance produced by phosphorylating beta-glucan above all, its drugs, and functional food.

[Claim 2]Application as an antiviral action substance produced by phosphorylating a DEKISU t run, its drugs, and functional food.

[Claim 3]A phosphoric acid method of sugar phosphorylation is zinc chloride pretreatment and urea scorification.

[Claim 4]A method of phosphorylating sugar phosphorylation is zinc chloride pretreatment enzymatic process.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]This invention relates to the phosphorylation method of sugar, and the antiviral action of the phosphorylation thing.

[0002]

[Description of the Prior Art]Conventionally, about phosphorylation of ****- hexose of sugar, only about one low esterification material per glucose 10 residue was obtained, but high phosphorylation was the most difficult. There are no side effects until it continues up to now, or the antiviral action substance with few side effects is not obtained.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]The purpose of this invention solves the high phosphorylation of sugar and the point of side effects which were problems conventionally, and there is in providing the antiviral action substance, drugs, and foodstuffs which do not have side effects extremely by high phosphorylation of sugar.

[0004]

[Means for Solving the Problem]This invention is obtained by glucose 10 residue only at most about one piece and low esterification material about phosphorylation of sugar, especially beta-glucan conventionally [(1)]. We found out that introduction of a phosphate group of the amount of abbreviation theories was possible by pretreating sugar with zinc chloride and using urea scorification.

(2) It found out having a remarkable anti-HIV operation, as a result of seeing an antiviral action of this quantity phosphorylation thing.

(3) A platelet aggregation checking action (anticoagulant action) of a high phosphorylation thing of this beta-glucan found out that target beta-glucan and beta-glucan sulfated compound compared with having remarkably, and there were, or they were remarkably low. [no]

[0005]

[Embodiment of the Invention]The drugs put in practical use by considering it as an anti-HIV agent have AZT (azidothymidine). Although it is a ***** anti-HIV agent at the inhibitory action of the reverse transcriptase of HIV, these drugs show side effects strong against a living body when treating, and check a patient's hematogenous functions, and making many patients show the symptoms of an ischemia operation of a degree very much is known. It is known that phosphorylation beta-glucan will control growth of HIV by the anti HIV activity examination in the examiner who used the person T cell origin (MT-4). About phosphorylation of beta-glucan, about at most one piece and low esterification material were obtained by glucose 10 residue until now. Since this invention was considered that phosphorylation by a urea molten state is useful as the phosphorylation method of dextran and beta-glucan, phosphorylation at a urea melting reaction was considered. In order to obtain a high phosphorylation thing, phosphoric acid concentration and reaction time were examined. Before reacting, it pretreated for activation of a hydroxyl group. Heating stirring was carried out in zinc chloride solution at pretreatment. It was considered as dextran after repeating EtOH precipitate and centrifugal separation for zinc, removing zinc, and pretreating what was dried, and beta-glucan. The urea melting reaction was

performed using it. For urea removal, it precipitated in MeOH whose solubility of urea is higher than EtOH, it performed urea removal by centrifugal separation, and after phosphorylation obtained dextran phosphoric acid and beta-glucan phosphoric acid in vacuum drying. It carried out to the check of the phosphate group in the phosphorus BANADO molybdenum acid process, and structural analysis was conducted by FT-IR. By this method, control of the number of introductory phosphate groups was attained by control of reaction time, and the phosphate group near theory has been introduced. It checked checking growth of HIV remarkably according to the number of introductory phosphate groups by the anti HIV activity examination which person T cell (MT-4) wO used using this, and this invention was completed.

[0006]Metal chloride etc. are examined as a pretreating agent of dextran and beta-glucan, zinc chloride is chosen, and the concentration has the desirable 30% order near saturation. As for demineralization-ized zinc, solvent precipitate, chelating resin, electrodialysis, dialysis, etc. are used.

[0007]As for the urea melting reaction in this invention, it is desirable to use 50 copies to dextran and one copy of beta-glucan which were pretreated from 100 copies from the urea 1 and 1.5 copies of phosphoric acid. Urea reaction temperature controls the number of introductory phosphate groups by 129 ** to 135 ** ****, reaction temperature, and reaction time. As for removal of urea after a reaction, and phosphoric acid, solvent precipitate, electrodialysis, dialysis, and a column chromatography are used.

[0008]

[Example]Although the example of this invention is given and also being explained concretely hereafter, this invention is not limited to these examples at all.

[0009]Heating stirring was carried out in 1,000 ml of zinc chloride solution 30% to the dextran 60g of the example 1 molecular weight 20,000 for 2 hours. Zinc chloride was removed by repeating EtOH precipitate and centrifugal separation and performing them after the reaction. The diaphragm performed the check. Vacuum drying of this was carried out and yield was 40%. 100 g of urea was added to this zinc chloride pretreatment dextran 2g, and also phosphoric-acid 7g In addition, the melting reaction was performed at 130 ** for 0 hour - 3 hours. After the melting reaction, it filtered, MeOH precipitate and centrifugal separation were repeated, and vacuum drying of the powder was obtained and carried out. It could come and the anti HIV activity in the examiner using the person T cell origin (MT-4) was seen. The result was shown in Table 1.

Table 1 urea melting reaction time and phosphate group content reaction-time 0-hour 1-hour 3-hour phosphate group content (%) 1.28 15.61 16.76 anti-HIV-1 effect 49 microg (50% control value)/ml

Toxic value ≥ 350 microg/ml (50%)

[0010]the result which the example 2 phosphorylating thing was beta-glucan extracted from maitake mushrooms, and also was performed like Example 1 -- a table -- it was shown in 2.

Table 2 urea melting reaction time and phosphate group content reaction-time 0-hour 1-hour 3-hour phosphate group content (%) 1.11 14.85 17.11 anti-HIV-1 activity 47microg/m 3.0microg/ml (50% control value)

Toxic value ≥ 358 microg/ml ≥ 500 microg/ml (50%)

[0011]The result which example 3 urea melting reaction temperature was 132 **, and also was performed like Example 2 was shown in Table 3.

a table -- 3 urea melting reaction time and phosphate group content reaction-time 0-hour 1-hour 3-hour phosphate group content (%) 1.11 14.99 17.55 anti-HIV-1 effect [] -- 2.9 microg (50% control)/ml

Toxic value ≥ 500 microg/ml (50%)

[0012]

[Example]the result which the example 4 phosphorylating thing was beta-glucan extracted from princess matsutake, and also was performed like Example 1 -- a table -- it was shown in 4.

Table 4 urea melting reaction time, and phosphoric acid content urea melting time 0-hour 1 hour 3 hour phosphate group content (%) 1.10 14.0 15.4 anti-HIV-1 effect 10.6 microg (50%)/ml

A toxic value (50%)[0013]

[Effect of the Invention]as mentioned above, the thing for which high phosphorylation of sugar is attained and a high phosphorylation thing has a remarkable high antiviral action by this invention
--- **** --- a broth and also by phosphorylating, toxicity found out coming, and inserting in and decreasing and completed this invention.

[0014]

[The document which indicated the chemical formula]

Table 1 Measurement result table 2 of Example 1 Measurement result table 3 of Example 2

Measurement result of Example 3

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-63968
(P2003-63968A)

(43) 公開日 平成15年3月5日(2003.3.5)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 K 31/716		A 6 1 K 31/716	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	Z 4 B 0 6 4
A 6 1 K 31/721		A 6 1 K 31/721	4 C 0 8 6
35/84		35/84	A 4 C 0 8 8
A 6 1 P 31/12		A 6 1 P 31/12	
審査請求 未請求 請求項の数 4 書面 (全 4 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001-295057(P2001-295057)	(71)出願人	598143169 株式会社ユーエムエー 静岡県沼津市大岡2297-6
(22)出願日	平成13年 8 月23日 (2001. 8. 23)	(72)発明者	赤羽 徹 栃木県那須郡那須町梁瀬400-9
		(72)発明者	木谷 孔保 埼玉県朝霞市本町 2-18-7
		(72)発明者	馬場 昌範 鹿児島県鹿児島市皇徳寺台 3-54-19
		(72)発明者	多々納 俊雄 静岡県沼津市大岡2297-6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 担子菌の糖アルコール及びデキストランの高リン酸化とそのリン酸化化合物の抗ウイルス作用、及び、医薬および機能性食品

(57) 【要約】

担子菌から抽出した糖アルコール及びデキストランを、塩化亜鉛で前処理後、尿素溶融反応又は酵素反応で高リン酸化する事により、著しく高い抗ウイルス活性物質の取得が可能になり、同時に副作用の低減も可能になり医薬品及び機能性食品として極めて有用である事を見出し本発明を完成した。

【課題】 高い抗ウイルス作用物質を提供する系である。

【解決の手段】 糖アルコール及びデキストランの高リン酸化方法を見出し、抗血小板凝集作用〔抗凝血作用〕の無い、抗ウイルス作用物質を提供する系である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 担子菌から抽出した糖アルコール、就中β-グルカンを燐酸化して得られる抗ウイルス作用物質、とその医薬品及び機能性食品としての応用。

【請求項2】 デキストランを燐酸化して得られる抗ウイルス作用物質、とその医薬品及び機能性食品としての応用。

【請求項3】 燐酸化が、塩化亜鉛前処理、尿素溶融法である糖の燐酸化法。

【請求項4】 燐酸化が、塩化亜鉛前処理酵素法である糖の燐酸化法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、糖の燐酸化方法及びその燐酸化物の抗ウイルス作用に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、糖の、特にポリ-ヘキソースの燐酸化に関しては、グルコース10残基当たり1個程度の低エステル化物しか得られず、高燐酸化は至難であった。又、現在に至るまで副作用のない、あるいは副作用の少ない抗ウイルス作用物質は得られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、従来問題であった、糖の高燐酸化と副作用の点を解決し、糖の高燐酸化により、極めて副作用のない抗ウイルス作用物質、医薬品及び食品を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明は、

(1) 従来、糖、特にβ-グルカンの燐酸化に関しては、グルコース10残基に高々1個程度と低エステル化物しか得られない。我々は、糖を塩化亜鉛で前処理し尿素溶融法を用いることにより略理論量の燐酸基の導入が可能である事を見出した。

(2) 本高燐酸化物の抗ウイルス作用を見た結果著しい抗HIV作用を有する事を見出した。

(3) 本β-グルカンの高燐酸化物の血小板凝集阻止作用(抗凝血作用)は、対象のβ-グルカン及びβ-グルカン硫酸化合物が著しく有するに比して、無いか或いは著しく低いことを見出した。

【0005】

【発明の実施の形態】 抗HIV剤とし実用化されている薬剤は、AZT(アジドチミジン)がある。HIVの逆転写酵素の阻害作用に基づく抗HIV剤であるが、この薬剤は、治療に際し生体に強い副作用を示し、患者の造血機能を阻害し、多くの患者に極度の貧血作用を発症させることが知られている。燐酸化β-グルカンは、人T細胞由来(MT-4)を用いた試験管内における抗HIV活性試験によりHIVの増殖を抑制することが知られている。今までβ-グルカンの燐酸化に関しては、グル

コース10残基にせいぜい1個程度と低エステル化物しか得られなかった。本発明はデキストラン及びβ-グルカンの燐酸化方法として、尿素溶融状態での燐酸化が有用であると考えられるので、尿素溶融反応での燐酸化を検討した。高燐酸化物を得るために、燐酸濃度、反応時間を検討した。反応を行なう前に、水酸基の活性化の為に前処理を行った。前処理には塩化亜鉛水溶液にて加熱攪拌した。亜鉛を、EtOH沈殿、遠心分離を繰り返して亜鉛の除去を行ない、乾燥させたものを前処理後のデキストラン及びβ-グルカンとした。それを用いて尿素溶融反応を行なった。燐酸化後は、尿素除去の為にEtOHより尿素的溶解度の高いMeOHにて沈殿、遠心分離にて尿素除去を行い、真空乾燥にてデキストラン燐酸及びβ-グルカン燐酸を得た。燐酸基の確認にはリンバナドモリブデン酸法にて行ない、FT-IRにより構造解析を行なった。本法により、反応時間の制御により、導入燐酸基数の制御が可能になり、理論に近い燐酸基を導入できた。これを用いて、人T細胞(MT-4)を用いた抗HIV活性試験によりHIVの増殖を、導入燐酸基数に応じて著しく阻害することを確認して本発明を完成した。

【0006】 デキストラン及びβ-グルカンの前処理剤として金属塩化物等を検討し塩化亜鉛を選択し、その濃度は、飽和に近い30%前後が望ましい。又、脱塩化亜鉛は、溶媒沈殿、キレート樹脂、電気透析及び透析等が用いられる。

【0007】 本発明における尿素溶融反応は、前処理したデキストラン及びβ-グルカン1部に対して、尿素1から100部、燐酸1.5部から50部使用することが望ましい。尿素反応温度は、129℃から135℃我欲、反応温度と反応時間により導入燐酸基数を制御する。反応後の尿素及び燐酸の除去は、溶媒沈殿、電気透析、透析、カラムクロマトグラフィが用いられる。

【0008】

【実施例】 以下、本発明の実施例を挙げ、更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

【0009】 実施例1

分子量20,000のデキストラン60gに対して30%塩化亜鉛水溶液1,000mlにて2時間加熱攪拌した。反応後、EtOH沈殿、遠心分離を繰り返して行なうことによって、塩化亜鉛を除去した。確認は伝導度計にて行なった。これを真空乾燥し収率は40%であった。この塩化亜鉛前処理デキストラン2gに尿素100gを加え、更に燐酸7g加え130℃で0時間~3時間溶融反応を行なった。溶融反応後、濾過し、MeOH沈殿、遠心分離を繰り返し、粉末を得、真空乾燥した。これお、人T細胞由来(MT-4)を用いた試験管内における抗HIV活性を見た。結果を表1に示した。

表 1 尿素溶融反応時間とリン酸基含有率

反応時間	0時間	1時間	3時間
リン酸基含有率 (%)	1.28	15.61	16.76
抗HIV-1効果 (50%抑制値)			49 μ g/ml
毒性値 (50%)			$\geq 350 \mu$ g/ml

【0010】 実施例2

は、実施例1と同様に行なった結果を表 2に示した。

被リン酸化物が舞茸から抽出した β -グルカンである他

表 2 尿素溶融反応時間とリン酸基含有率

反応時間	0時間	1時間	3時間
リン酸基含有率 (%)	1.11	14.85	17.11
抗HIV-1活性 (50%抑制値)		47 μ g/ml	3.0 μ g/ml
毒性値 (50%)		$\geq 358 \mu$ g/ml	$\geq 500 \mu$ g/ml

【0011】 実施例3

に行なった結果を表3に示した。

尿素溶融反応温度が132℃である他は実施例2と同様

表 3 尿素溶融反応時間とリン酸基含有率

反応時間	0時間	1時間	3時間
リン酸基含有率 (%)	1.11	14.99	17.55
抗HIV-1効果 (50%抑制)			2.9 μ g/ml
毒性値 (50%)			$\geq 500 \mu$ g/ml

【0012】

る他は、実施例1と同様に行なった結果を表 4に示した。

【実施例】 実施例4

被リン酸化物が姫マツタケから抽出した β -グルカンであ

表 4 尿素溶融反応時間とリン酸含有率

尿素溶融時間	0時間	1時間	3時間
リン酸基含有率 (%)	1.10	14.0	15.4
抗HIV-1効果 (50%)			10.6 μ g/ml
毒性値 (50%)			9

【0013】

【発明の効果】上記のように、本発明により、糖の高リン酸化が可能になり、且つ高リン酸化物は、著しく高い抗ウイルス作用を有することをみだし、更にリン酸化する事により毒性がきはめて低減される事を見出し本発明を完成した。

【0014】

【化学式を記載した書面】

- 表1 実施例1の測定結果
表2 実施例2の測定結果
表3 実施例3の測定結果

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

FI

(参考)

C12P 19/04
19/08C12P 19/04
19/08

B

(4) 開2003-63968 (P2003-63968A)

Fターム(参考) 4B018 MD32 MD33 MD82 ME09 MF10
MF12
4B064 AF14 CA21 CB27
4C086 AA01 AA02 EA20 MA01 NA14
ZB33
4C088 AA02 BA08 BA12 MA52 NA14
ZB33